

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公表

⑫ 公表特許公報(A)

平5-505524

⑬ 公表 平成5年(1993)8月19日

⑭ Int.Cl. ¹	⑮ 識別記号	⑯ 庁内整理番号	⑰ 審査請求 未請求	⑱ 国際公開番号	⑲ 国際公開日
A 23 J 3/34	Z NA	7238-4B	千億審査請求 有	WO91/13554	平3(1991)9月19日
A 23 L 1/335		8214-4B			
C 07 K 15/02		8519-4H			

(全 11 頁)

⑳ 発明の名称 タンパク質加水分解物

㉑ 特 願 平3-506279

㉒ 出 願 平3(1991)3月8日

㉓ 翻訳文提出日 平4(1992)9月8日

㉔ 国 際 出 願 PCT/DK91/00089

㉕ 国際公開番号 WO91/13554

㉖ 国際公開日 平3(1991)9月19日

㉗ 優先権主張 ㉘ 1990年3月9日㉙ デンマーク(DK)㉚ 633/90

㉛ 発 明 者 ダンブマン、クラウス

デンマーク国、デーコー-2860 ソエボルグ、? テーホー、ホ
エイエ グラドサクセ 81

㉜ 出 願 人 ノボ ノルディスク アクティ

デンマーク国、デーコー-2880 バグスバエルト、ノボ アレ
ーゼルスカブ (普通名なし)

㉝ 代 理 人 弁理士 青木 朗 外3名

㉞ 指 定 国 AT(広域特許), BE(広域特許), CH(広域特許), DE(広域特許), DK(広域特許), ES(広域特許), FR
(広域特許), GB(広域特許), GR(広域特許), IT(広域特許), JP, LU(広域特許), NL(広域特許), S
E(広域特許), US

最終頁に続く

10 要 約

1. G14及び/又はA5p組合でのタンパク質の限定された特異的な加水分解を得るための方法であって、以下の特徴を有する群衆:

- (a) これはグルタミン酸(Glu)及びアスパラギン酸(Asp)残基に対して特異的なセリンプロテアーゼである;
- (b) これは1gの酵素タンパク質が少くとも25cpu(本明細書にて定義する)の比活性を有する;
- (c) これは約23,600の分子量上の分子重を有する;
- (d) これはジソプロピルホスホニルオリデートによって阻害されるが、フェニルメタンスルホニルフルオリドによって阻害されない;
- (e) これは6.5~10.0のpHの範囲においてその最大活性の75%以上を示す;

を含んで成り、その他のタンパク質分解活性も實質的に有さない酵素調製品をタンパク質性物質に加え、次いで所望の加水分解の程度(本発明にて定義される)が得られるまで中絶又は弱いアルカリ性のpHにてインキュベーションし、その後酵素を適切に不活性化せしめることによってこのインキュベーションを終了させ、C-末端にグルタミン酸又はアスパラギン酸残基を有するペプチドの形成をもたらす、前記方法。

2. タンパク質分解酵素が、微生物、特に細菌によって産生されるものである請求の範囲第1項記載の方法。

3. 細菌がB. リシエニホリス(Bacillus licheniformis)の菌株を含む、ペナリスリシエニホリス(Panaris licheniformis)の株である請求の範囲第2項記載の方法。

4. タンパク質分解酵素が、図4に示されるアミノ酸配列、又はその誘導体を含む請求の範囲第1~3項のいずれかに記載の方法。

5. pHを、タンパク質性物質と酵素調製品とのインキュベーション中、一定に保持する、請求の範囲第1項記載の方法。

6. タンパク質性物質と酵素調製品とのインキュベーションを、昇温-冷却法によって行う、請求の範囲第1項記載の方法。

7. タンパク質性物質が、動物性タンパク質、例えば魚類タンパク質、カゼイン、肉類タンパク質、魚類タンパク質、卵白、卵白もしくはゼラチン、又は植物性タンパク質、例えば大豆タンパク質、穀類タンパク質、例えば小麦グルテンもしくはゼイン、またはタンパク質、むらさきうろこやタンパク質、えんどうタンパク質、マメ科タンパク質、綿の炭タンパク質又はごまの炭タンパク質から成る群から選ばれる、請求の範囲第1項記載の方法。

8. タンパク質性物質に加えられるべき酵素の量が、0.05~1.5cpu/タンパク質100g、特に0.1~5cpu/タンパク質100gの範囲内にある、請求の範囲第1項記載の方法。

9. 酵素、インキュベーション混合物の温度を約70℃に保つことにより、又はインキュベーション混合物のpHを約5.0未満に下げることにより不活性化し、請求の範囲第1項記載の方法。

10. 第一のタンパク質分解酵素に加え、他のタンパク質分解酵素をタンパク質性物質に加える、請求の範囲第1~9項のいずれかに記載の方法。

11. 他のタンパク質分解酵素が、トリプシンおよびトリプシン-プロテアーゼから成る群から選ばれる、請求の範囲第10項記載の方法。

12. 第一のタンパク質分解酵素が、0.05~5cpu/タンパク

- 1 -

BEST AVAILABLE COPY

質 100g の範囲内の量で加えられ、さらに第二のタンパク質分解酵素が 0.1 ~ 1.0 cps /タンパク質 100g の範囲内の量で加えられる、請求の範囲第 13 項記載の方法。

13. タンパク質加水分解物であって、以下の特徴を有するタンパク質分解物：

- (a) これはグルタミン酸 (Glu) 及びアスパラギン酸 (Asp) 残基に対して特異的なセリンプロテアーゼである；
- (b) これは 1g の酵素タンパク質当たり少なくとも 25 cps (単位酵素にて定義する) の活性を有する；
- (c) これは約 23,500 の見かけ上の分子量を有する；
- (d) これはジイソプロピルネオヘキシルオリグレートによって阻害されるが、フェニルメチルスルホニルフルオリドによって阻害されない；
- (e) これは 6.5 ~ 10.0 の pH の範囲においてその最大活性の 75% 以上を示す；

を含んで成り、その他のタンパク質分解酵素を實質的に有さない酵素組成品によるタンパク質の Glu 及び / または Asp 結合の特異的な加水分解の結果としての、C-末端にグルタミン酸又はアスパラギン酸残基を有するペプチドより本質的に成る、断片タンパク質加水分解物。

14. タンパク質性物質が、動物性タンパク質、例えば乳類タンパク質、カゼイン、肉類タンパク質、魚類タンパク質、赤血球、卵白もしくは卵黄タン、又は植物性タンパク質、例えば大豆タンパク質、穀類タンパク質、例えば小麦グルテンもしくはホセイン、なたねタンパク質、むらさきまごやしタンパク質、えんどうタンパク質、マメ科タンパク質、納豆タンパク質又はごまの実タンパク質から成る群から選ばれ、請求の範囲第 13 項記載のタンパク質加水分解物。

明 細 書

タンパク質加水分解物

発明の分野

本発明はタンパク質の限定された特異的な加水分解を得る方法、この方法によって得られるタンパク質加水分解物、及びこのタンパク質加水分解物を含む食品に関する。

発明の背景

プロテアーゼによるタンパク質の酵素的加水分解はもとのタンパク質の栄養価を保持するタンパク質加水分解物を生成する、且昇に達した方法であり、従ってこの方法は通常の食品に存在する十分な量の食品タンパク質を摂取もしくは消化できない一定の患者の食糧において有利に利用されようか、又は状況のためのミルク代替品の栄養価を向上せしめるために利用されよう。更に、タンパク質加水分解物ヒトの栄養食品のために伝統的に利用されている起源から調製されることができ、そして例えばそれ自体の食品として又は他の食品への添加剤のいずれかとして利用されよう。

今日このタイプのタンパク質加水分解物の調製のために利用されているプロテアーゼは、広い特異性を有するプロテアーゼ、例えばバチルス *Bacillus licheniformis* (バチルス) フルカリ性プロテアーゼである。広い特異性を有するプロテアーゼを用いたときに出くわす問題は、しばしば生成されるタンパク質加水分解物の強い苦味にある。この苦味は、懸濁された疎水性アミノ酸残基を有するペプチドの形成をもたらす、疎水性側鎖を有するアミノ酸のタンパク質の切断の結果である。食品タンパク質又は食

特表平5-505524 (2)

料。

15. 高い比率の 1000 ~ 20,000 の範囲、好ましくは 1000 ~ 10,000 の範囲における分子量を有するペプチドと、低い比率の約 1000 未満の分子量を有するペプチドを含んで成る、請求の範囲第 13 項記載のタンパク質加水分解物。

16. タンパク質の Glu および / または Asp 結合の特異的な加水分解の結果としての C-末端にグルタミン酸又はアスパラギン酸残基を有するペプチドとは別に、タンパク質の Leu および / または Asp 結合の特異的な加水分解の結果としての C-末端に Leu および / または Asp 残基を有するペプチドを含んで成る、請求の範囲第 13 項記載のタンパク質加水分解物。

17. 高い比率の分子量 1000 ~ 10,000 を有するペプチドおよび低い比率の分子量約 1000 未満を有するペプチドを含んで成る、請求の範囲第 16 項記載のタンパク質加水分解物。

18. 請求の範囲第 13 ~ 15 項のいずれかに記載のタンパク質加水分解物を含んで成る食品。

19. 請求の範囲第 15 又は 17 項記載のタンパク質加水分解物を含んで成る食品。

20. 1 種類以上の脂肪源および / または 1 種類以上の炭水化物源を、更に含んで成る、請求の範囲第 18 又は 19 項記載の食品。

めのペプチドにおいて、この疎水性側鎖は、折りたたまれているタンパク質内にこの側鎖がかくれてしまうタンパク質分子の三次構造に基いて選択しつづい、小さめのペプチドがタンパク質分子のタンパク質分解の切断によって形成されたなら、この疎水性側鎖は暴露され、従って近づく表面の疎水性及び親水性レセプターに受けられやすくなる。この現象が苦味を生じせしめることが分っている (H. Wieser and H.-D. Belitz, *Z. Lebensw. Unters. Forsch.* 159, 1975, 頁 65-72; 及び H. Wieser and H.-D. Belitz, *Z. Lebensw. Unters. Forsch.* 160, 1976, 頁 303-302、を参照のこと)。

このタンパク質加水分解物の苦味の問題を、出発タンパク質の加水分解の程度を限定すること、即ち、プロテアーゼによって切断されるペプチド結合の数を限定すること、例えば加水分解の程度をモニターし、そして適切な加水分解の程度が得られたならこのタンパク質分解反応を止めること (例えば、J. Adler-Nissen, *Enzymic Aspects of Food Proteins*, Applied Science Publishers, London, 1986 を参照のこと) によって解決することが提案されている。このような加水分解物は、少なくともそれらが含まれている食品の他の構成成分と一緒に、弱められた苦味を示すことが見い出されている。

加水分解の程度をコントロールするその他の方法は、タンパク質分子を一定のアミノ酸残基でのみ切断する特異的なプロテアーゼを利用することにある。これは J. H. Chober らの *J. Agric. Food, Chem.* 35, 1988, 頁 220-224 に記載され、これにはタンパク質をグルタミン酸及びアスパラギン酸残基にて特異的に加水分解せしめる *スタフィロコッカス アウレウス* (*Staph. aureus*) V8 プロテアーゼの利用が報告されている。

特表平5-505524 (9)

発明の概要

置くべきことに、バチルス リシニエホルミスプロテアーゼはグルタミン酸及びアスパラギン酸残基に特異的であり、従ってタンパク質加水分解物であってそれ自体は香味を有さないものをもち、タンパク質の限定された十分な加水分解を提供することができる。従って、本発明はGlu及び/又はAsp結合でのタンパク質の限定された特異的な加水分解を得るための方法であって、以下の特徴を有する酵素：

- (a) これはグルタミン酸 (Glu) 及びアスパラギン酸 (Asp) 残基に対して特異的なセリンプロテアーゼである；
- (b) これは1%の酵素タンパク質当り少なくとも0.5mM (本明細書にて定義する) の比活性を有する；
- (c) これは約3,500の分子量を有する；
- (d) これはジオソプロピルカルボキシフルオリドによって阻害されるが、フェニルメチルカルボキシフルオリドによって阻害されない；
- (e) これは、5〜10,000のpHの範囲においてその最大活性の75%以上を示す；

を含んでなり、その他のタンパク質分解活性を實質的に有さない酵素調製品をタンパク質性物質に加え、次いで所望の加水分解の程度が得られるまで中絶又は弱いアルカリ性のpHにてインキュベーションし、その酵素酵素を適切に不活性化せしめることによってこのインキュベーションを終了し、C-末端にグルタミン酸又はアスパラギン酸残基を有するペプチドの形成をもたらす方法に関連する。

上記に定義したタンパク質分解酵素は、バチルス リシニエホルミスによって生成されるサブチリシンA (Serrinase) によって生成される。

いて利用するタンパク質分解酵素よりも活性が弱い、即ち、これはその酵素に対して弱い親和性を有するといういくつかの特徴を有する。カゼインの加水分解による彼らの報告において、この酵素は48時間のインキュベーションの後にも、1%程度の加水分解しか得られなかったことも示している。

発明の詳細な説明

本方法において利用されるタンパク質分解酵素は微生物、特に菌類によって生産されるものでよい。このような菌類はバチルス リシニエホルミスの株、例えばサブチリシンA及び能率に定額したタンパク質分解酵素に相当する他のプロテアーゼを生産することによって知られる株でありうる。この場合において、このタンパク質分解酵素は、後に参照すべきアルカリ性プロテアーゼの生産を促進せしめる条件のもとでこの菌類を培養し、その後このプロテアーゼ活性物質を回収する方法、例えば前記した米国特許第4,255,931号に詳細のプロセスによって選別することによって調製される。

バチルス リシニエホルミスの株は、突然変異株、例えばサブチリシンAをコードする遺伝子が、例えば實質的に前記の米国特許第4,255,931号に記述のタンパク質分解酵素をコードする遺伝子の不活性化が関与されている）に開示の方法による突然変異調製物質、例えばユトグアジンの判別を含む常用の突然変異調製方法によって不活性化されている突然変異株でもよい。前方、サブチリシンA遺伝子の不活性化は、組換えDNA操作、例えばこのサブチリシンA遺伝子の中に1もしくは複数のヌクレオチドを導入せしめてこの配列を破壊せしめることによって行うこともできる。このことは、例えば相同性置換、例えばF. A. Ferrariら、J. Biol. Chem. 254 (1979), 頁1513-1515

A) の発明物として、米国特許第4,255,931号において既に開示されている。しかしながら、この米国特許においてこの酵素の特異的なタンパク質分解活性の記載はなく、従って本発明のタンパク質加水分解方法におけるその有用性はこの特許におけるこの酵素の開示自体によって予測できない。本発明に従い、置くべきことにこのタンパク質分解酵素はC1u及びAsp残基に対して特異的な酵素であることがわかった。この性質は本発明に関して重要であり、なぜならこれはタンパク質のGlu及び/又はAsp残基での限定された、且つ特異的な加水分解を提供するからである。このようなミノ酸残基は親水性であり、生成される弱い香味のタンパク質加水分解物をもたらす、従ってこれが製造されている食品の味に何ら悪い影響を及ぼさない。本発明によって生成される苦みのないタンパク質加水分解物は、それ自体の食品として利用されることも可能とし、そしてそれが製造される食品の関与を、例えば幼児のためのミルク代替品のような温和な味のものと混合して広げることにも可能とする。

本明細書において、「加水分解の程度」なる語は、このタンパク質分解酵素によって切断されるペプチド結合の数を示すものと理解される。加水分解の最大の程度とは、むしろタンパク質分子における實質的に全てのGlu及びAsp残基での切断である。加水分解の程度は、J. Adler-NissenのJ. Agric. Food Chem. 27, 1979, 頁1256に詳細のトリプトベンゼンスルホン酸アッセイを用いる、下記の例2において酵素の通りに規定した。

従って、本方法において用いるタンパク質分解酵素は、前記のJ. Adler-Nissenらによるタンパク質の限定された加水分解のために規定されたSerrinase、アウレウスプロテアーゼと類似の特異性を有する。しかしながら、アウレウスプロテアーゼは本方法にお

に評価の通りに行われうる。このタンパク質分解酵素は、この酵素を産生する微生物、例えばバチルス リシニエホルミスのDNA又はゲノムライブラリーからDNA配列を抽出し、このDNA配列を適切な発現ベクターに導入せしめ、このベクターによって適当な宿主微生物を形質転換せしめ、この酵素の生産を促進せしめる条件のもとでこの宿主を増殖せしめ、そしてこの培養物からこの酵素を回収せしめることによって提供される。これらの工程は標準的方法によって行われうる。T. Maniatisら、Molecular Cloning: Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, 1982を参照のこと。

本プロセスの特定の態様において、このタンパク質分解酵素は添付した図4において示すアミノ酸配列又はその調製法を有するものである。

本明細書において、「酸塩基」なる語は、突然タンパク質のC-及びN-末端のいずれかもしくは両方に1もしくは複数のアミノ酸を付加することにより、突然アミノ酸配列における1もしくは複数の異なる部位での1もしくは複数のアミノ酸の置換により、突然タンパク質のいずれかの、もしくは両方の末端での又はアミノ酸配列における1もしくは複数の部位での1もしくは複数のアミノ酸の欠失により、あるいは突然アミノ酸配列における1もしくは複数の部位での1もしくは複数のアミノ酸の挿入により、この酵素のタンパク質分解活性がこれによって減弱を受けていないことを条件として、突然酵素から誘導されたタンパク質分解酵素を意味するものと理解される。

加水分解反応の際、このインキュベーション混合物のpHは中絶又は若干アルカリ性であるときに、ペプチド結合の切断に盛ついて下がる傾向にある。加水分解の程度をモニターするため、ある特

特表平5-505524 (4)

の態様において、このタンパク質性材料とこの酵素調製品とのインキュベーション中にpHを一定に保つことが好ましい。これにこのインキュベーション混合物を培養、例えばNaOH、KOH、CO₂(OR)、又はNH₃によって調整することによって行われうる。pHのモニター及び決定はpH-スタットにおいて自動的に行うのが好都合でありうる。

他の特定の態様において、非pH-スタット法、即ち、このタンパク質性材料とこの酵素調製品のインキュベーションの際にpHを一定に保たせない加水分解を行うことが好ましい。この態様において、加水分解の程度は加水分解の際の機殻圧の上昇を測定することによって容易に追跡することができる。

本方法によって有利に加水分解せしめらるタンパク質性物質は従来の文献における加水分解のために挙げられている任意のタンパク質又はタンパク質性物質でありうる。適宜なタンパク質性物質は動物性タンパク質、たとえば乳酪タンパク質、カゼイン、肉類タンパク質、魚類タンパク質、卵白球、卵白もしくはゼラチン、又は植物性タンパク質、例えば大豆タンパク質、穀類タンパク質、例えば小麦グルテンもしくはゼイン、なたねタンパク質、むらさきまごやしタンパク質、えんどうタンパク質、マメ科タンパク質、鶏の蛋タンパク質又はごまの蛋タンパク質である。

十分な加水分解の程度を得るため、このタンパク質加水分解酵素をこのタンパク質性物質は、0.05-1.5cpw/タンパク質100g、特に0.1-5cpw/タンパク質100gの量において加えることが適宜でありうる。確立されている方法に従い、このタンパク質分解酵素を、このインキュベーション混合物の温度を約70度以上に高めることにより、又はこのインキュベーション混合物のpHを約5.0以下に下げることにより不活性化せしめることが適宜

でありうる。

上記に定義したタンパク質分解酵素単独で得られるものより高い加水分解の程度、即ち、酵素pH値で可溶性であるより高い収量のペプチドを必要とする目的に關して、驚くべきことにこのタンパク質性物質に他のタンパク質分解酵素を加えることが有利であることが見出された。この異なるタンパク質分解酵素は、上記に定義したタンパク質分解酵素と同様に、親水性アミノ酸、特にロイシン又はアラニン以外の親水性アミノ酸に特異的なものであることが好ましい。適切な異なるタンパク質分解酵素の例はトリプシン及びその他のトリプシン-様プロテアーゼである。トリプシンはシステイン及びAraE基基でのペプチド結合を特異的に切断するプロテアーゼである。

「トリプシン-様プロテアーゼ」なる語は、トリプシンに似た特異性を有するプロテアーゼを意味することと意図している。適宜なトリプシン-様プロテアーゼは**フアラウム (Furukawa)** (例えばWO89/06272に開示されている) 種から得ることができ得るプロテアーゼである。

このタンパク質性物質を第1のタンパク質分解酵素及び異なるタンパク質分解酵素の両方によって加水分解せしめるとき、このタンパク質性物質に加える酵素の対当の量は、第1のタンパク質分解酵素に關しては0.05-5cpw/タンパク質100gであり、そして異なるタンパク質分解酵素に關しては0.1-10cpw/タンパク質100gの範囲であることが適切である。

他の観点において本発明は、以下の特徴を有するタンパク質分解酵素：

- (a) これはグルタミン酸 (Glu) 及びアスパラギン酸 (Asp) 基基に対して特異的なセリンプロテアーゼである；
- (b) これは1gの酵素タンパク質当り少なくとも25cpw (※

明細書にて定義する) の比活性を有する；

- (c) これは約23,600の見かけ上の分子量を有する；

(d) これはジイソプロピルホルスホスホリレートによって阻害されるが、フェニルメタンスルホニルフルオリドによっては阻害されない；

(e) これは6.5-10.0のpHの範囲においてその最大活性の75%以上を示す；

を合んでおり、その他のタンパク質分解酵素を實質的に有さない酵素調製品によるタンパク質のGlu及び/又はAsp結合の特異的な加水分解の結果としての、C-末端にグルタミン酸又はアスパラギン酸残基を有するペプチドより本質的に成るタンパク質加水分解物に關連する。

適切なタンパク質の選択は、タンパク質の加水分解に通常用いられる任意のタンパク質性物質、例えば前記したもの又はその組合せでありうる。

本発明に従い、相対的に高い比率の高分子量ペプチド及び相対的に低い比率の低分子量ペプチドを有するタンパク質加水分解物は、高い比率で低分子量ペプチドを含む加水分解物よりも容易に弱い苦味を有することが見出された。上記に定義した特定のタンパク質分解酵素を用いることにより得られる限定された特異的な加水分解は、この好ましい重量範囲におけるペプチドを提供するのに好ましく適する。従って、本発明のタンパク質加水分解物は、高い比率の1000-20,000の範囲、特にしくは1000-10,000の範囲における分子量を有するペプチドと、低い比率の約1000未満の分子量を有するペプチドを合んで成ることが好ましい。

特定の観点において本発明は、タンパク質のGlu及び/又はAspの結合での特異的な加水分解の結果としてのC-末端にグルタ

ミン酸又はアスパラギン酸残基を有するペプチドとは別に、タンパク質のLeu及び/又はAraEの結合での特異的な加水分解の結果としてのC-末端にLeu及び/又はAraE残基を有するペプチドを含んで成るタンパク質加水分解物に關する。このタンパク質加水分解物は、加水分解物の高い程度の加水分解を必要とする目的、例えばタンパク質濃縮物としての飲料に加水分解物を含ませることを目的とするときに特によく適する。前記した通り、加水分解の程度の上昇はタンパク質性物質を他の特異的なプロテアーゼ、例えばトリプシンによって加水分解せしめることによって適宜に得られうる。この場合において、この加水分解物は、高い比率の1000-10,000の範囲における分子量を有するペプチドと低い比率の約1000以下の分子量を有するペプチドを適切に合んで成りうる。

更なる観点において本発明は、本発明のタンパク質加水分解物を合んで成る食品に關する。このタンパク質加水分解物はGlu/AraE特異的なプロテアーゼ添加により調製されたものであっても、又は前記した通りLeu/AraE特異的なプロテアーゼによる異なる加水分解によって調製されたものであってもよい。タンパク質加水分解物を含む食品は先行の文献から周知であり、これらの中にはこの加水分解物の存在によって生ずる苦味の問題も記載されている。

本発明の重要な食品は、虚弱な患者であって通常の食料を介しては彼らの必須栄養をほとんど又は全く摂取できない者のための食料栄養である。このような食品において、本発明のタンパク質加水分解物はしばしば唯一のタンパク質性成分となることがあり、なぜなら本発明のタンパク質加水分解物の苦味のなきは、このタイプの食品における含有物として特に注意されるからである。食料栄養製品はしばしば液体又は半液体であるため、それに含まれるタンパク質加水分解物は高濃度の可溶性ペプチドを含むことが好ましい。

特表平5-505524 (5)

従って、高い収量の可溶性ペプチドを得るため、タンパク質性出発物質をGlu/Asp特異的プロテアーゼ及び前記したLys/Ars特異的プロテアーゼの両方によって加水分解せしめることにより調整したタンパク質加水分解物を含むことが好ましい。

食品に含まれるタンパク質加水分解物の量は典型的には1~30重量%の範囲であろう。他方、本発明の食用食品は米国特許第4,100,024号又はヨーロッパ特許明細書第248,747号に詳細の通りに実質的に作られる。従って、この製品は更に脂肪及び/又は炭水化物の適当な組成を含むもの。脂肪の適当な組成は例えば植物油(例えばトウモロコシ又は大豆油等)でありうる。炭水化物の適当な組成は例えばスクロース又はラクトース、加水分解デンプン、マルトデキストリン等でありうる。食料製品は通常の添加剤、例えば風味料、甘味料、ビタミン、ミネラル及び微量元素を含んで成りうる。

本発明の他の重要な食品は幼児のためのミルク代替品である。このミルク代替品はこのタイプの製品に関する先行文献(例えばEP 322,589号)において示されているのと実質的に同じ方法であるが、但し既知の製品に含まれているタンパク質加水分解物を本発明のタンパク質加水分解物に代えて作られる。このタイプの製品において、タンパク質加水分解物の香味のなさは明らかに好都合であり、なぜなら幼児は香味を有するミルクを非常に嫌うからである。この場合においても、Glu/Asp特異的プロテアーゼ及びLys/Ars特異的プロテアーゼの両方による出発タンパク質の加水分解によって作られる加水分解物を含むことが好ましいことがある。本発明の加水分解物は低アレルギー性ミルク代替品の有利に含まれることができ、この加水分解物は成長ミルクタンパク質よりも有意に低いアレルギー性を有する。

($\text{Glu} = \text{m} \text{ NaOH}$; $\text{Asp} = \text{m} \text{ Pa}^{\circ}$; $\text{Lys} = \text{m} \text{ Osm/kg}$).

本発明を、本発明の範囲を何ら限定することを感じない以下の例において更に説明する。

例1

バチルス リジエンホルムス SP 446 プロテアーゼの精製及び SP 446 プロテアーゼの吸収

アルカリアーゼ (Alcalase; 商標) PPA1616を米国特許第4,266,031号に詳細の通りに精製した。精製したSP 446プロテアーゼの収率は、基質としてC12-Phe-Leu-Gly-PNA (Boehringer Mannheim)を用い、出発及び精製SP 446プロテアーゼの酵素活性を測定することによって決定した。この酵素溶液において存在するスブチリシンAを不活性化せしめるためにフェニルメタンスルホニルフルオリド(1:10容重)を加えることが必要であり、なぜならスブチリシンAは明らかにPhe又はLeuの後を切断せしめることによってこの基質を分解することができるからである。出発物質(40ml)の酵素活性はパーキン-エルマーラムダー(Parkinson-Lamda)リーダーにおいて405nm/0.1mlでの吸光度として測定され、そして166,920であると決定された。精製物質(3ml)の酵素活性を同様に測定し、そして158,720と決定された。従って、SP 446プロテアーゼの収率は95%であった。

タンパク質加水分解性

SP 446プロテアーゼのタンパク質加水分解活性を、苦質としてカゼインを用いて測定し、27cpa/gを得た。1カゼインプロテアーゼ単位(cpa)は、以下に記載する如く、標準条件下、毎分至1アミノ酸の1ミラモルを放出する酵素の量(セリン標準との比較に

本発明の食品は、食品精製物として、又はこの食品に他の性質が提供されるために本発明のタンパク質加水分解物を含むこととなる。従って、この食品に含まれるタンパク質加水分解物は例えば、正牌せしめたい骨を本発明の方法によってGlu/Asp特異的プロテアーゼによって処理せしめることにより、骨から得られるスクラップ肉(例えば、機械的に回収せしめた肉、即ち、屠殺場において屠殺した動物から切り取った通常の肉片の後に残っている骨上の肉)一般的な方法のより詳しい説明については、本出願人の同時係属特許出願PCT/DK89/000272を参照のこと)に基づいてよい。次いで、得られたタンパク質加水分解物を適切にミントメント製品、例えばソーセージ又はパテに加えてよい。

本発明の食品は、タンパク質内容物の一部又は全てが植物及び/又は肉類タンパク質に基づくタンパク質加水分解物より成るベビーフード製品であることもできる。

図面の簡単な説明

本発明を添付した図面を参照しながら以下の例において更に説明し、ここで:

図1は、SP 446プロテアーゼのpH活性を示し;

図2は、トリポリリン酸ナトリウム(STPP)の存在下(図10角)及び非存在下(図10角)におけるSP 446プロテアーゼの温度活性を示す図であり;

図3は、SP 446プロテアーゼによるインスリンの切断を示し;

図4は、SP 446プロテアーゼのアミノ酸配列を示し(ここでアミノ酸は独立された一文字コードで示している);そして

図5は、乳タンパク質環状物のSP 446加水分解に由来する、精製、塩析及び塩基消費データを示す

より決定)として定義される:

カゼイン(ハマルステン(登録商標)、メルク社、ゲルムスタッフ、FRG)の2%(w/v)溶液を、グリソリンおよびロビンソン(J. Chem. Soc., 1931, P1431)によって記載されるユニバーサル緩衝液を用いて調製し、pH9.5に調節した。2mlの基質溶液を25℃で30分間水中で予じめインキュベートした。ユニバーサル緩衝液(pH9.5)1ml量り、約0.2~0.3cpaに相当する、精製1ml当り0.5gを含有する1mlの酵素溶液を添加する。25℃で30分間インキュベーション後、急冷剤(17.9gの三塩化酢酸、29.9gの酢酸ナトリウムおよび19.8gの酢酸を含む)、酸イオン水で500mlとした溶液(5ml)を添加して反応を停止する。ブランクは、試験溶液と同様に調製するが、急冷剤は酵素反応の前に添加する。反応混合物を20分間水中で保持し、しかる後ワトマン42の濾紙で濾過する。この分析方法を記載するパンフレットは、要求によりノボルディスク社(デンマーク国)から入手できる。

第一アミノ基を、次の如く0-フルクトザルデヒド(OPA)を用いたそれらの濃度によって測定する:

1. 0.2gの固形物(二ナトリウム10水和物および2.0gのフタル酸ナトリウムを150mlの水中に溶解する。次いで4mlのメタノールに溶解した160mgのOPAを、400と1のギョムブトエタノールと共に添加し、次いで濁液を水で200mlにする。3mlのOPA試薬に、混合しながら、上記で得られた濁液400を添加する。340mlの塩化硫酸(OD)を約5分後に測定する。また、OPAテストを、100mlのユニバーサル緩衝液(pH9.5)中に10mgのセリンを有するセリン標準液を用いて行う。プロテアーゼ活性は次式を用いOD測定値から計算する:

$$\text{cpu / 酵素溶液 (ml)} : \frac{(OD_0 - OD_{\infty}) \times C_{\text{cell}} \times Q}{(OD_{\text{cell}} - OD_0) \times MW_{\text{cell}} \times t}$$

$$\text{cpu / 酵素製剤 (g)} = \text{cpu / ml} \times b$$

ここで、 OD_0 、 OD_{∞} 、 OD_{cell} および OD_0 はそれぞれ試料溶液、ブランク、セリン標準液および反応液の光学濃度であり、 C_{cell} は標準液（この場合 0.1 mg/ml）中のセリン (mg/ml) の濃度であり、 MW_{cell} はセリン (105.09) の分子量である、 Q は酵素溶液に対する希釈因子（この場合 5）であり、 t はインキュベーション時間（5）（この場合 30 分）である。

pH 依存性

SP446 プロテアーゼの活性の pH 依存性を、上記の OFPA カゼイン法で測定するか、恒し、ユニバーサル緩衝液を種々の pH 値、すなわち pH 5、7、8、9、10 および 11 に調整した。結果を図 1 に示す。この図から明らかなように、SP446 プロテアーゼは最適 pH を pH 8 ~ 10 の範囲に有する。

温度依存性

SP446 プロテアーゼの活性の温度依存性を、上記の OFPA カゼイン法で測定した。

但し、酵素反応は、種々の温度、すなわち、15℃、30℃、40℃、50℃、60℃ および 70℃ で行い、酵素反応は、多くの商業上の試料中、通常の時期である 0.1% トリプシン配ナトリウム (STPP) の存在および非存在下で行った。結果を図 2 に示す。この図から SP446 プロテアーゼは、STPP の存在如何にかかわらず、約 50℃ の最適温度を有する。

G14 特性性

SP446 プロテアーゼの G14 特性性を次の如く測定した：
ユニバーサル緩衝液 (pH 9, 5, 同上) 中 1 mg/ml にトイン

完全アミノ酸配列を図 4 に示す。

このアミノ酸配列に基づいて、SP446 プロテアーゼの分子量は、23,600 であった。

OFPA による SP446 プロテアーゼの不溶性化

PMSP (インプロバノール中 1%) と共に酵素を 1 対 10 (容重比) の割合でインキュベーションすると、SP446 プロテアーゼの不溶性化は同様に生じなかった。しかし 0.1 の 10 mM MOPS (pH 7.2) および 1.0 の 0.1 M ジニアロピルホスホフルリデート (DFP) と共に 1.0 ml (1 mg/ml) の酵素を 60 分間インキュベーションすると、酪素 C2-phenol-ローグイup NNA に関するその活性によって測定される如く、酵素の完全な不溶性化がもたらされた。

実験例 2

乳糖タンパク質の加水分解

8.00 ml の脱イオン水に溶解した 7.5 g のスプレー乾燥乳糖タンパク質 (Lactogen-20, デンマークプロテイン A/S, Nr. Tius, 8920 ビデバック, デンマークより入手可能) に、SP446 プロテアーゼおよび剛凍上のアトリアシン (Pancreas Tryptase Novo 6.03, ノボルティクス社より入手可能、対照として用いる) の 1.00 g のタンパク質あたり 1.7 cpu をそれぞれ添加した。プロテアーゼを、インフュージョンシート No. B183 (1984 年) 1 月、「Use of Good Grade Alkalase® or Neutrase® for controlled Enzymatic Hydrolysis of Proteins」と標題されたシート (ノボルティクス社より要求により入手可能) に記載の如きいわゆる pH-a1a 法により、乳糖タンパク質と共に、4 時間 65℃ でかつ pH 8.0 でインキュベーションした。乳糖タンパク質に対して測定された加水分解の程度は、SP446 では 12.

特表平5-505524 (6)

エリン 0.5 ml および同様に 7.5 ml の SP446 プロテアーゼ (0.6 cpu / 1) を、37℃ で 120 分間インキュベートした。50 ml の (NH₄) を添加して反応を停止した。

インシュリン分子を、多数のペプチド断片に分解した。これらを分離し、通常の C-18 カラム (ハイパーシク 2 ツー プー 18、メルク社製の 5 μm の粒子) を用い、逆相 HPLC により分離した。断片を次の時刻で 60 分間こう配移動した。

A. 0.2 M の酢酸ナトリウムおよび 0.1 M のリン酸；

pH 2.5；

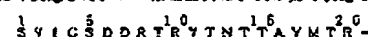
B. アセトニトリル/水、50%；

線状グラジエントは 90% A / 10% B から 80% A / 20% B であった。

分離した断片を、アプライドバイオシステム (フォスター社、CA、USA) モデル 470 A 気相シーケンサーを用い、自動エドマン分解によりアミノ酸配列決定装置に供給し、次いでフェニルチオヒダントイン (PTC) アミノ酸を、S. チム等「Secretion of human insulin by a transformed yeast cell', *PNAS Letters* 212 (2), 1987, p.307」により記載される如く、HPLC により分析した。インシュリン分子の分解断片は、図 3 に示される如く測定される。

N-末端アミノ酸配列

酵素 SP446 プロテアーゼの N-末端アミノ酸配列を、次節で記載の如く決定した。N-末端配列は、次の如く決定した：



完全なアミノ酸配列

完全なアミノ酸配列を DNA 配列から決定した。DNA 配列は、「発明の詳細な説明」の節で記載の如く標準的方法で決定した。完

1% であり、トリプシンでは 10.4% であって (% はタンパク質中のペプチド結合の全数から計算する)

SP446 に対する実験結果は、表 1 および図 5 に示される。

表 1

時間 分	粘度 mPa·s	Δ 粘度/濃度 mPa·s/g	粘度/濃度 ml/g
0	6.72	0	0
15	25.92	92	7.70
30	59.32	94	6.35
60	47.04	90	5.31
90	32.84	99	3.38
120	24.96	100	3.62
180	18.24	110	3.95
240	17.28	103	16.22

加水分解度は次式によって計算できる。

$$DH = \frac{\text{分解したペプチド結合の数}}{\text{ペプチド結合の全数}} \times 100$$

タンパク質中のペプチド結合の全数は、そのアミノ酸組成から計算できる。分解したペプチド結合の数は、トリプトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) を用いた次の方法により水溶液中の O-アミノ基の分析から決定できる。

9.25 × 10⁻³ ~ 2.5 × 10⁻² M のアミノ基 / 含有するリッパル 0.25 ml を、pH 8.2 のホスフェート緩衝液 2.00 ml と試管内で反応する 2 ml の 0.1% TNBS 溶液を添加し、次いで試験管を振とうし、50 ± 1℃ の水浴中 30 分間保持する。インキュベーション中、試験管および水浴をブルエニウム塩でカバーする。と言うのは、ブランク反応が容易により促進されるからである。60 分後、4.00 ml の HCl を添加して反応を停止させ、次いで 3.40 ml の水に對する分光光度計学的に読みとる前に試験管を逆転で 30 分間放置する。詳細は、アブラーニッソン (J. Agric. Food. Chem., 27, 1979, p.1256, 1262) を参照のこと。

電くへをことに以下の内容が見出された。SP446による乳型タンパク質の加水分解は、反応混合物の粘度増加をもたらした。このことは、親水性であるグルタミン酸およびアスパラギン酸を含むペプチド結合に対するSP446プロテアーゼの特異性に帰因するか、又は水解物中のプラスチン反応に帰因するであろう。粘度増大（すなわち、加水分解が生起している）の一定増加にかかわらず、透過圧重量モル濃度は加水分解中一定には増加しないことは注目されるが、このことは酵素の加水分解中には通常起こるであろう。粘度は、最初の30分中に増加し、次いで透過圧重量モル濃度の増加が比較的ゆるやかになる同じ点でその最大に達する。

実施例2

SP446プロテアーゼを用いた大豆タンパク質の加水分解

4000mlの大豆タンパク質濃縮物の懸濁液（この懸濁液は約8%タンパク質（N X 6, 25）を含む）を、SP446プロテアーゼ（2700u/g 酵素のり、1%）および緩衝液上のトリプシン（パンクレアストリプシンNOVO 3, 0.5, ノボルディスク性より入手可能）（2%, 3, 300u/g）の混合物を用い、pH 8, 9 および 10 の温度で加水分解に供した。pH-スタット（Stat）（ラジオメーター、コペンハーゲン、デンマーク国）を用いて監視した加水分解中、pHを4.0 NaOHを添加して一定に保持した。2時間加水分解後、加水分解度（先に定義）を測定し、14%を得た。次いで0.1N HClを添加して、pH 4.2にし酵素を失活させた。次いで、加水分解混合物を、助剤として塩化ナトリウムを用い、透析を通して上澄みをデカントする前に30分間放置した。原液を改修するため、上澄みを2〜4秒間140°Cに加熱し、残物を真空室内にフラッシュした。更に、生成物をH.S.オルセルおよびJ.アルダーニッセン「Application of Ultra- and Hyperfiltration

特許平5-505824 (7)

tion 25 during production of enzymatically modified proteins, J

ASC Symp. Ser. 154, pp.133-169) に記載される如く脱脂した。

得られた水解物を、上記の如く調整したが、出し、1.9%のアルカラーゼ（Alcalase登録商標）2.4L（54人リ/8gタンパク質分解活性）に対するタンパク質の重量に就いて計算）をタンパク質の加水分解に用いた。

かくして得られたタンパク質水解物（3.5%溶液）を、香味に対する通常の三角試験において比較した。主張者は、二者の生成物の香味における差異は著しいものであると判断し、更にSP446およびトリプシンで調整した水解物を併用したものとした。

SP446および商業上のトリプシンの混合物を用いた大豆タンパク質濃縮物の加水分解は、反応混合物の粘度増加をもたらした。このことは、親水性であるグルタミン酸およびアスパラギン酸を含むペプチド結合に対するSP446プロテアーゼの特異性に帰因するか、又は水解物中のプラスチン反応に帰因するであろう。

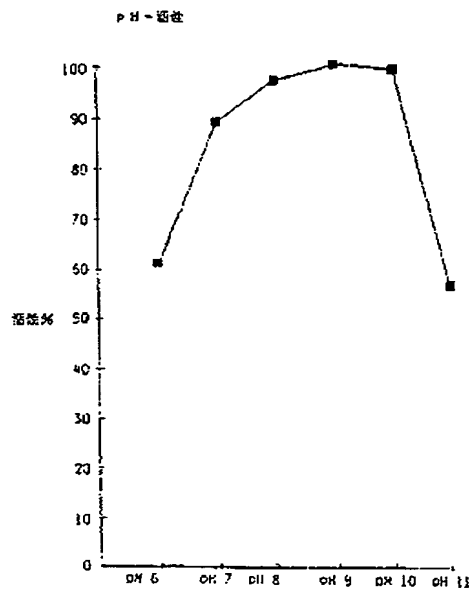


Fig. 1

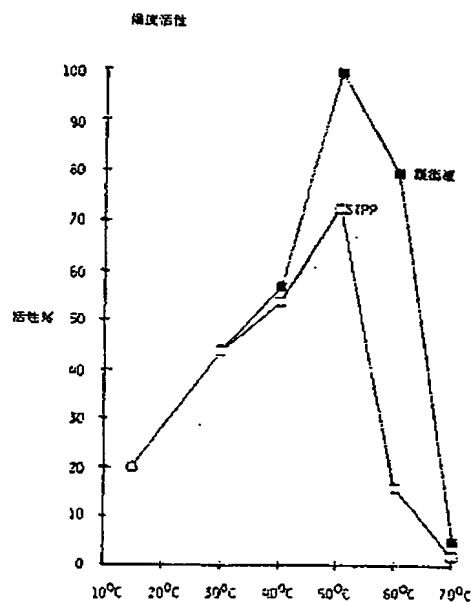


Fig. 2

初表平5-505524 (8)

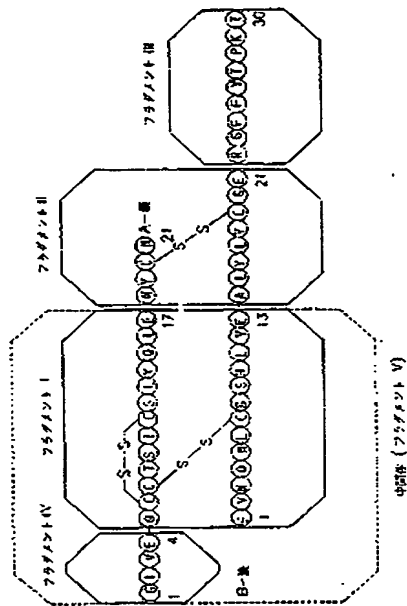


Fig. 3

1 11 21 31 41 51 61 71 81 91 101 111 121 131 141 151 161 171 181 191 201 211 221 231 241 251 261 271 281 291 301 311 321 331 341 351 361 371 381 391 401 411 421 431 441 451 461 471 481 491 501 511 521 531 541 551 561 571 581 591 601 611 621 631 641 651 661 671 681 691 701 711 721 731 741 751 761 771 781 791 801 811 821 831 841 851 861 871 881 891 901 911 921 931 941 951 961 971 981 991 1001

Fig. 4

実 験 法

本発明は、タンパク質の限定された特異的な加水分解を得るための方法、該方法によって得られる水解物およびタンパク質水解物を含有する食品に関する。

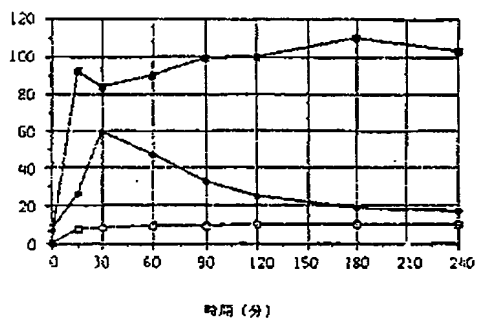


Fig. 5

補正書の翻訳文提出書
(特許法第184条の2)

特許平5-505524 (9)
請求の範囲

平成4年9月9日

特許庁長官 麻 政 次 郎

1 特許出願の表示

PCT/DK91/00069

2 発明の名称

タンパク質加水分解薬

3 特許出願人

住 所 デンマーク国、デーヨー-2800 バグスバエルト、
ノボ アレ (普通名)

名 称 ノボ ノルディスク アクティブセルスカブ

4 代理人

住 所 東京都港区虎ノ門一丁目8番10号新光ビル
F105 電話 (3504)0781

氏 名 弁護士 (5573) 青 木 朝 之 秀 樹
(外3名) 新 井 隆 夫

5 補正書の提出年月日

1992年2月21日

6 添付書類の目録

補正書の翻訳文



1通

s-v-i-a-s-d-d-c-c-r-v-l-a-l-s-
a-y-p-y-r-e-i-v-h-i-s-a-s-i-s-
s-c-l-g-w-m-l-g-p-k-l-v-a-l-s-
g-h-c-i-y-d-i-s-s-g-a-f-a-g-l-
b-l-v-s-p-g-r-h-g-l-s-y-p-y-g-
s-y-k-a-c-r-y-f-i-p-s-g-w-r-e-
g-n-l-n-y-d-y-g-a-i-a-l-a-p-
i-g-a-l-v-g-y-f-g-y-s-y-l-l-s-
s-l-v-g-s-i-c-v-l-i-s-g-y-p-g-d-
k-l-a-g-l-q-w-q-h-s-g-p-i-a-i-
s-e-l-y-k-l-q-y-a-m-d-l-y-g-h-
q-s-g-s-p-v-i-g-g-s-s-e-l-a-
c-s-g-p-c-s-l-a-v-h-l-a-g-v-y-
g-g-s-s-y-a-r-g-l-r-l-l-k-e-v-
f-d-a-l-l-n-w-k-d-s-a-q

を有する請求の範囲第1項記載の方法。

3. a)を、タンパク質性物質と酵素調製品とのインキュベーション中、一定に保持する、請求の範囲第1項記載の方法。

4. タンパク質性物質と酵素調製品とのインキュベーションを、昇pH法によって行う、請求の範囲第1項記載の方法。

5. タンパク質性物質が、動物性タンパク質、例えば乳清タンパク質、カゼイン、肉類タンパク質、魚類タンパク質、卵白、卵黄もしくはゼラチン、又は植物性タンパク質、例えば大豆タンパク質、穀類タンパク質、例えば小麦グルテンもしくはゼイン、なたねタンパク質、ひらききまごやしタンパク質、えんどうタンパク質、マメ科タンパク質、絹の製タンパク質又はごまの油タンパク質から成る群から選ばれる、請求の範囲第1項記載の方法。

1. Glu及び/又はAsp割合でのタンパク質の規定された特異的な加水分解を降るための方法であって、以下の特徴を有する請求:

(a) これはグルタミン酸 (Glu) 及びアスパラギン酸 (Asp) 残基に対して特異的なセリンプロテアーゼである;

(b) これは1gの酵素タンパク質当たり少なくとも2.5cpu (カゼインプロテアーゼ単位) の比活性を有する;

(c) これは約23, 800の見かけ上の分子量を有する;

(d) これはジソプロピルホスホフルオリドによって阻害されるが、フェニルメタンスルホニルフルオリドによっては阻害されない;

(e) これは6, 5~10, 0のpHの範囲においてその最大活性の75%以上を示す;

(f) これは、B. subtilis (Licheni-fossils) の菌株によって産生されるものである;

を含んでなり、その他のタンパク質分解酵素と實質所に育さない酵素調製品をタンパク質性物質に加え、次いで所望の加水分解の程度が得られるまで中性又は弱いアルカリ性のpHにてインキュベーションし、その後該酵素を適切に不活性化せしめることによってこのインキュベーションを終了させ、C-末端にグルタミン酸又はアスパラギン酸残基を有するペプチドの形成をもたらす、前記方法。

2. タンパク質分解酵素が、確立された一文字コードで示される次のアミノ酸配列:

6. タンパク質性物質に加えられるべき酵素の量が、0.05~1.5cpu /タンパク質100g、特に0.1~5cpu /タンパク質100gの範囲内にある、請求の範囲第1項記載の方法。

7. 酵素を、インキュベーション混合物の濃度を約70℃に高めることにより、又はインキュベーション混合物のpHを約5, 0未満に下げることにより不活性化する、請求の範囲第1項記載の方法。

8. 第一のタンパク質分解酵素に加え、他のタンパク質分解酵素をタンパク質性物質に加える、請求の範囲第1~7項のいずれかに記載の方法。

9. 他のタンパク質分解酵素が、トリプシンおよびトリアプシンヘキサプロテアーゼから成る群から選ばれる、請求の範囲第8項記載の方法。

10. 第一のタンパク質分解酵素が、0.05~5cpu /タンパク質100gの範囲内の量で加えられ、さらに第二のタンパク質分解酵素が0.1~10cpu /タンパク質100gの範囲内の量で加えられる、請求の範囲第8項記載の方法。

11. タンパク質加水分解薬であって、以下の特徴を有するタンパク質分解酵素:

(a) これはグルタミン酸 (Glu) 及びアスパラギン酸 (Asp) 残基に対して特異的なセリンプロテアーゼである;

(b) これは1gの酵素タンパク質当たり少なくとも2.5cpu (カゼインプロテアーゼ単位) の比活性を有する;

(c) これは約23, 800の見かけ上の分子量を有する;

(d) これはジソプロピルホスホフルオリドによって阻害されるが、フェニルメタンスルホニルフルオリドによっては阻害されない;

接表平5-505524 (10)

(c) これは 5.5 ~ 19.0 の pH の範囲においてその最大活性の 75% 以上を示す:

(1) これは、B. リシニカルミス (licheniformis) の実質体を含む、バシラス リシニカルミス (Bacillus licheniformis) の根によって寄生され得るものである；

を合んで成り、その他のタンパク質分解活性を実質的に有さない酵素製剤によるタンパク質のG₁と及び/又はA₂結合の特異的な加水分解の結晶として、C-末端にグルタミン酸又はアスパラギン酸残基を有するペプチドより実質的に成る、弱陽イオン交換加水分解物。

12. タンパク質性物質が、動物性タンパク質、例えば鶏卵タンパク質、カゼイン、肉類タンパク質、魚類タンパク質、赤血球、卵白もしくはゼラチン、又は植物性タンパク質、例えば大豆タンパク質、穀類タンパク質、例えば小麦グルテンもしくはゼイン、またはタンパク質、むらさきうまごやしタンパク質、えんどうタンパク質、マメ科タンパク質、綿の実タンパク質又はごま油タンパク質から低分子から遊びれる、請求の範囲第11項記載のタンパク質加水分解物。

13. 高い比容の1000-20,000の範囲、特にしくは1000-10,000の範囲における分子量を有するペプチドと、低い比容の約1000未満の分子量を示すペプチドを含んで吸着、破壊の範囲(表1)短時間のタンパク質加水分解物。

14. タンパク質 Glu および / 又は Asp 結合の特異的加水分解の結果としての C-末端にグルタミン酸又はアスパラギン酸残基を有するペプチドとは別に、タンパク質の Leu および / 又は Arg 結合の特異的加水分解の結果としての C-末端に Lys および /

又はA : g 類基を含むペプチドを含んでなる、請求の範囲第1項記載のタンパク質加水分解物。

15. 高い比容の分子量1000-10,000を有するペプチドおよび高い比容の分子量約1000未満を有するペプチドを合入する。採取の範囲料14吸収型のタンパク質加水分解物。

18. 箇求の範囲第11～13項のいずれかに記載のタンパク質加水分解物を含んでなる食品。

17. 陸産物の範囲第14又は15項に記載のタンパク質加水分解物を含んでなる食品。

19. 1種以上の脂肪源および/又は1種以上の炭水化物源を、更に含んでゐる、請求の範囲第16又は17項記載の食品。

[illegible]

No.	Description of material, name of author, title, date, etc.	Date of receipt
1	J. Harte, Food Chem., Vol. 36, 1958, "Chemical Properties of all: Solubility and Emulsifying Properties of Caseins Modified Enzymatically or Synthetically using 68 Protease". See page 220 - page 228 especially 220	1-20
	..	
2	I. L. Green, Vinter, -Forsch., Vol. 35, 1976, "Kinetik der Hydrolyse von Proteinen und Peptiden". See page 353 - page 392	1-20
3	W. A. 410024 (MOLTER-MISSEN) 31 July 1970, see column 1, line 28 - line 38	1-20
4	QS, 3, 4266231 (TAMM ET AL) 6 May 1963, see entry 1	3-20
5	WS, 3, 4107714 (HOLMES C. JULY) 13 August 1970, see column 1, line 21 - line 35; column 4; abstract	1-20
	..	

特表平5-505524 (11)

国際特許公告

PCT/OK 91/00060

This document contains information that may be used for the purpose of determining the patentability of an invention. It is not to be construed as a statement of opinion or as a representation of the results of a search or examination. The information is provided for the purpose of facilitating the understanding of the prior art and is not to be used for the purpose of determining the patentability of an invention.

Patent number of the country of origin	Priority date	Patent number of the country of origin	Priority date
EP-A2- 0319486	89-09-02	AU-D- 2004499	89-09-23
		JP-A- 2005539	90-01-16
EP-A1- 0255239	97-02-28	AU-D- 3018139	90-01-25
EP-A1- 0304303	90-08-23	GI-A- 1025194	90-09-29
NO-A1- 8703706	87-03-02	AD-B- 591236	89-11-30
		AG-D- 6834067	87-07-19
		AG-D- 6834787	87-07-25
		EP-A- 0276211	87-09-24
		EP-A- 0346051	88-01-07
		JP-T- 03662003	03-09-11
		JP-T- 02500009	89-09-11
		NO-A- 87-03725	87-03-02
US-A- 4300024	78-05-11	DE-A- 850470	77-07-19
		FI-A-D- 2332903	77-08-12
		GB-A- 1547931	79-06-27
		JP-E- 1112997	82-09-10
		JP-A- 12114996	77-09-04
		JP-T- 56927471	81-10-12
		NO-A- 7706527	77-07-21
US-A- 4206531	81-05-09	DE-A- 874426	80-01-03
		DE-A- 642275	80-04-13
		DE-A- 2226878	80-01-17
		EP-A-D- 6066328	80-01-07
		FR-A- 2430493	80-05-01
		GB-A- 2024830	80-01-16
		JP-A- 7025222	80-01-08
		SE-A-D- 647561	80-12-03
US-A- 4197394	78-09-15	DE-A- 759635	78-04-12
		DE-A- 1064807	81-02-03
		DE-A- 2745654	70-04-29
		FR-A- 2367772	78-05-12
		GB-A- 1830993	70-03-29
		JP-A- 53047566	78-04-18
		LU-A- 78234	79-06-01
		NL-A- 7710511	78-04-17
		SE-A- 7710423	78-04-14

第1頁の続き

Int. Cl.	識別記号	市内整理番号
C 12 P 21/08		8214-4B
A 23 J 3/08		7236-4B
		7236-4B
		7236-4B
C 12 N 9/56		7823-4B
(C 12 N 9/56		
C 12 R 1:10)		

優先権主張 ◎1991年2月6日◎デンマーク(DK)◎199/91

◎発明者 モルテンセン, スターン ペン デンマーク国, デーヨー-2830 ハグスバエルト, 1. デーベ
ニケ, アルデルシビレバイ 131,◎発明者 ブソフ, ベテル デンマーク国, デーヨー-2000 フレデリクスベルグ, ホフメヤル
スパイ 21

◎発明者 エリクセン, スベント デンマーク国, デーヨー-3450 アレロエト, デルフィンバイ 8

特表平5-505524

【公報種別】特許法第17条第1項及び特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成10年(1998)12月8日

【公表番号】特表平5-505524

【公表日】平成5年(1993)8月19日

【年追号数】

【出願番号】特願平3-506279

【国際特許分類第6版】

A23J 3/34

3/08

3/10

3/16

A23L 1/305

C12N 9/56

C12P 21/06

//C12N 9/56

C12R 1:10)

【F I】

A23J 3/34

3/08

3/10

3/16

A23L 1/305

C12N 9/56

C12P 21/06

特表平5-505524

手 続 画 面

平成5年2月14日

特許庁長官 殿 特 許 第 1 号

1. 発明の名称

新規なタンパク質の製造方法

2. 発明の要旨

タンパク質の製造方法

タンパク質の製造方法

タンパク質の製造方法

3. 発明の背景

タンパク質の製造方法

タンパク質の製造方法

タンパク質の製造方法

タンパク質の製造方法

4. 発明の目的

タンパク質の製造方法

5. 発明の概要

タンパク質の製造方法

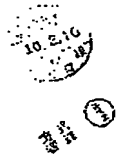
6. 発明の効果

タンパク質の製造方法

7. 発明の産業上の利用

タンパク質の製造方法

特許庁長官 殿



発明の概要

1. 本発明は、タンパク質の製造方法に関するものである。

(a) タンパク質 (G1) のアミノ酸配列 (A1) は、タンパク質の製造方法に関するものである。

(b) 本発明は、タンパク質の製造方法に関するものである。

(c) 本発明は、タンパク質の製造方法に関するものである。

(d) 本発明は、タンパク質の製造方法に関するものである。

(e) 本発明は、タンパク質の製造方法に関するものである。

(f) 本発明は、タンパク質の製造方法に関するものである。

(g) 本発明は、タンパク質の製造方法に関するものである。

(h) 本発明は、タンパク質の製造方法に関するものである。

(i) 本発明は、タンパク質の製造方法に関するものである。

(j) 本発明は、タンパク質の製造方法に関するものである。

(k) 本発明は、タンパク質の製造方法に関するものである。

(l) 本発明は、タンパク質の製造方法に関するものである。

(m) 本発明は、タンパク質の製造方法に関するものである。

(n) 本発明は、タンパク質の製造方法に関するものである。

(o) 本発明は、タンパク質の製造方法に関するものである。

(p) 本発明は、タンパク質の製造方法に関するものである。

(q) 本発明は、タンパク質の製造方法に関するものである。

(r) 本発明は、タンパク質の製造方法に関するものである。

(s) 本発明は、タンパク質の製造方法に関するものである。

(t) 本発明は、タンパク質の製造方法に関するものである。

(u) 本発明は、タンパク質の製造方法に関するものである。

(v) 本発明は、タンパク質の製造方法に関するものである。

(w) 本発明は、タンパク質の製造方法に関するものである。

(x) 本発明は、タンパク質の製造方法に関するものである。

(y) 本発明は、タンパク質の製造方法に関するものである。

(z) 本発明は、タンパク質の製造方法に関するものである。

(aa) 本発明は、タンパク質の製造方法に関するものである。

(ab) 本発明は、タンパク質の製造方法に関するものである。

(ac) 本発明は、タンパク質の製造方法に関するものである。

(ad) 本発明は、タンパク質の製造方法に関するものである。

(ae) 本発明は、タンパク質の製造方法に関するものである。

(af) 本発明は、タンパク質の製造方法に関するものである。

(ag) 本発明は、タンパク質の製造方法に関するものである。

(ah) 本発明は、タンパク質の製造方法に関するものである。

(ai) 本発明は、タンパク質の製造方法に関するものである。

(aj) 本発明は、タンパク質の製造方法に関するものである。

(ak) 本発明は、タンパク質の製造方法に関するものである。

(al) 本発明は、タンパク質の製造方法に関するものである。

(am) 本発明は、タンパク質の製造方法に関するものである。

(an) 本発明は、タンパク質の製造方法に関するものである。

特表平5-505524

こ、１）および／または１）組合でのタンパク質の特定の位置での修飾として、
 のくー基にヒスチジンおよび／またはトリプトファン残基を付するペプチドを含む、請求項
 １）に記載のタンパク質組成物を含む。

１５．高い分子量が分子量より１０、０００を有するペプチドおよび低い
 分子量が分子量より１０、０００未満を有するペプチドを含む、請求項１）に記載のタン
 パク質組成物を含む。

１６．請求項１）～１５）のいずれか一項に記載のタンパク質組成物を含有する
 の食品。

１７．請求項１）～１５）に記載のタンパク質組成物を含有する食品。

１８．１）～１５）のいずれか一項に記載のタンパク質組成物を、更に含む、同
 請求項１）～１５）に記載の食品。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.